

Aus der Wissenschaftlichen Einrichtung (WE 6) Pathologie
im Klinikum Westend der Freien Universität Berlin

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. F. Niedobitek

Gastrinabbau durch partikelfreie Überstände aus Rattenleberhomogenat

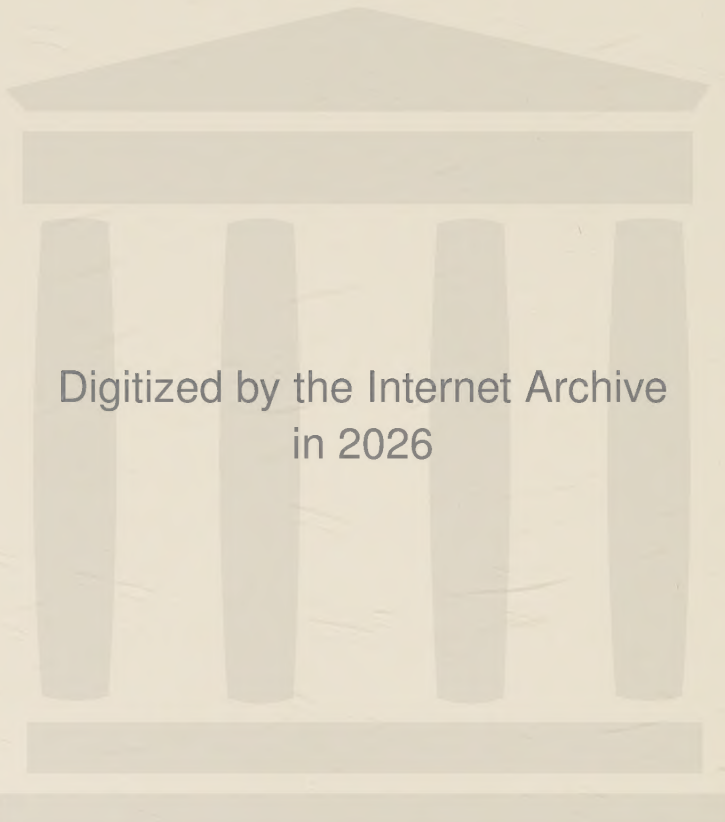
Chromatographische und elektrophoretische Analyse

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Appel, Wolfgang
aus Steinheim/Westfalen

1973



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41550808_0007

Aus der Wissenschaftlichen Einrichtung (WE 6) Pathologie
im Klinikum Westend der Freien Universität Berlin

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. F. Niedobitek

**Gastrinabbau durch partikelfreie Überstände
aus Rattenleberhomogenat**

**Chromatographische und elektrophoretische
Analyse**

Inaugural-Dissertation

**zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin**

vorgelegt von

Appel, Wolfgang

aus Steinheim/Westfalen

Referent: Priv.-Doz. Dr. H.-P. Seelig

Korreferent: Professor Dr. T. Diamantstein



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 9.11.1973

Inhaltsverzeichnis

	<u>Seite</u>
A. Einleitung und Problemstellung	1
B. Methoden	7
1. Gastrinherstellung	7
2. Untersuchungen über den Abbau von Gastrin II	10
a. Herstellung von partikelfreien Überständen aus Leberhomogenat	10
b. Chromatographische Untersuchungen	10
c. Hochspannungselektrophoretische Untersuchungen	13
3. Die Desamidierung von Gastrin nach Leberschädigung durch Tetrachlorkohlenstoff	13
a. Schädigungsmodus	13
b. Homogenate und NH_3 -Bestimmung	14
C. Ergebnisse	16
1. Hydrolyse von Gastrin II durch partikelfreie Überstände von Rattenleberhomogenat	16
2. Hochspannungselektrophoretische Auftrennung der Gastrinfraktionen	27
3. Amidhydrolyse von Gastrin I durch normale und CCl_4 -geschädigte Rattenlebern	29
D. Diskussion	31
E. Zusammenfassung	37
F. Literaturverzeichnis	38

A. Einleitung und Problemstellung

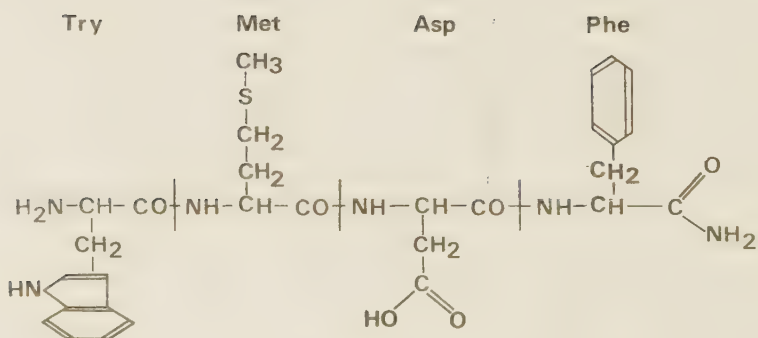
1905 veröffentlichte EDKINS seine Theorie der humoralen Stimulation der Säureproduktion des Magens durch ein Hormon, das er *G a s t r i n* nannte. EDKINS zeigte, daß intravenös injizierte wässrige Antrumextrakte bei der Katze die Säureproduktion des Magenfundus steigerten, während sich dieser Effekt mit Extrakten der Corpusschleimhaut nicht erzielen ließ (EDKINS 1906).

1964 gelang GREGORY und TRACY die Reindarstellung von Gastrin aus dem Schweineantrum. Kurz darauf konnte die Aminosäuresequenz ermittelt werden und die Synthese erfolgen (GREGORY und TRACY 1964; GREGORY, HARDY, JONES, KENNER und SHEPPARD 1964; ANDERSON, BARTON, GREGORY, HARDY, KENNER, McLEOD, PRESTON, SHEPPARD und MORLEY 1964). Somit wurde das Studium der physiologischen Wirkungen dieses Hormons möglich (s. Tab. I).

Es lassen sich aus der Antrumschleimhaut des Menschen und einiger Säugetierarten zwei Heptadeka-peptide isolieren: Gastrin I und II. Das Molekulargewicht beträgt für das menschliche Gastrin I 2096, für Gastrin II 2176. Gastrin I und II unterscheiden sich durch die zusätzliche Sulfatestergruppe am Tyrosinrest bei Gastrin II (s. Tab. II, Position 12). Gastrin von Mensch, Schaf, Schwein, Hund und Rind unterscheiden sich in ein oder zwei Aminosäureresten in dem für die biologische Wirkung unwichtigen Molekularanteil (s. Tab. II).

Die biologische Wirkungsgruppe (s. Abb. 1), das "aktive Zentrum" des Hormons ist die C-terminale Tetrapeptidgruppe Try-Met-Asp-Phe-NH₂ (TRACY und GREGORY 1964). Das synthetische Pentagastrin (N-tert-Butyloxycarbonyl-β-Ala-Try-Met-Asp-Phe-NH₂) Mol.Gew. 767,9 enthält die gleiche terminale Tetrapeptidgruppe und hat gleiche pharmakologische Wirkungen wie Gastrin (MORLEY, TRACY und GREGORY 1965).

Die physiologischen Wirkungen von Gastrin I und II sind gleich.



C — terminaler Gastrinrest [13—17]

Abb. 1: Die biologische Wirkungsgruppe, das C-terminale Tetrapeptid.

Tab. I: Wirkungen von Gastrin

	Stimulation	Hemmung
<u>Magen</u>		
H ⁺ -Sekretion	+ (1)	+ (1)
Pepsinsekretion	+ (1)	+ (1)
Intrinsic-Faktor	+ (7)	
Tonus	+ (1)	+ (1)
<u>Pankreas</u>		
HCO ₃ -Sekretion	+ (1)	
Enzymsekretion	+ (1)	
Insulinsekretion	+ (4,5)	
<u>Unterer</u>		
<u>Ösophagussphinkter</u>		
Tonus	+ (8)	
<u>Leber</u>		
HCO ₃ -Sekretion	+ (6)	
Gallefluß	+ (1)	
<u>Gallenblase</u>		
Tonus	+ (1)	
<u>Duodenum, Dünndarm</u>		
Brunnersche Drüsen	+ (3)	
Tonus	+ (1)	
<u>Ileum</u>		
Na ⁺ -Resorption		+ (2)
Blutdruck		+ (1)

- Literatur:
- | | | |
|-----|----------------------|--------|
| (1) | GREGORY und Mitarb. | (1964) |
| (2) | GINGELL und Mitarb. | (1968) |
| (3) | GROSSMAN | (1968) |
| (4) | REHFELD | (1971) |
| (5) | UNGER und Mitarb. | (1967) |
| (6) | ZATERKA und Mitarb. | (1966) |
| (7) | SHEARMAN und Mitarb. | (1967) |
| (8) | GILES und Mitarb. | (1969) |

Neben den beiden Heptadekapeptiden wurde im Serum eine hochmolekulare Gastrinform vom Mol.Gew. ~ 7000 gefunden. Sie wandert bei der Serumelektrophorese langsamer anodisch als die Albuminfraktion. Das Heptadekapeptid findet sich dagegen vor der Albuminfraktion (YALOW und BERSON 1970; BERSON und YALOW 1971). Reindarstellung und Strukturaufklärung des hochmolekularen Gastrin erfolgten bisher nicht.

Die Bildungsstätten für Gastrin liegen im A n t r u m (EDKINS 1905; KOMAROV 1938; GREGORY und TRACY 1964; McGUIGAN 1968), im D u o d e n u m (LAI 1964; CHARTERS, REEDER und THOMPSON 1969; BERSON und YALOW 1971), im J e j u n u m (CHARTERS, REEDER und THOMPSON 1969; BERSON und YALOW 1971) und im P a n k r e a s (McGUIGAN und GREIDER 1971).

Besondere pathophysiologische Bedeutung hat die Gastrinbildung im Pankreas erhalten. Beim Zollinger-Ellison-Syndrom, das sich durch die Trias Hypersekretion, therapieresistente Ulcera ventriculi und/oder duodeni und nicht insulinbildende Tumoren des Pankreas auszeichnet, werden Serumgastrinwerte von > 1000 pg/ml gefunden (McGUIGAN und TRUDEAU 1968; STREMPLE und MEADE 1968; HANSKY und CAIN 1969; YALOW und BERSON 1970; FRIESEN, BOLINGER, PEARSE und McGUIGAN 1970; ISENBERG, CSENDES und WALSH 1971). Der Normwert beträgt < 100 pg/ml. Die Tumoren stammen von gastrinbildenden Zellen des Pankreas ab, die histologisch schwer einzuordnen sind, daher "Nicht-B-Zellen" genannt werden (CREUTZFELDT 1970) und autonom Gastrin sezernieren (GREGORY, TRACY, AGARWAL und GROSSMAN 1969).

Weiterhin finden sich erhöhte Serumgastrinwerte bei Hyperparathyroidismus (TRUDEAU und McGUIGAN 1969; PTAK und KIRSNER 1970; ARNOLD, KETTERER, FEURLE, CREUTZFELDT und CREUTZFELDT 1971) und perniziöser Anämie (YALOW und BERSON 1970; McGUIGAN und TRUDEAU 1970; HANSKY, KORMAN, NOVENY und St. JOHN 1971; GANGULI, CULLEN und IRVINE 1971). Im letzten Fall sind die erhöhten Werte durch den Ausfall der negativen Rückkoppelung bei fehlender Magensäure bedingt.

Neben der Ulcusgenese durch eine autonome Gastrinbildung beim Zollinger-Ellison-Syndrom sind andere gastrinabhängige Patho-

mechanismen denkbar, die zum Ulcusleiden führen können. Hierbei ist an einen gestörten Gastrinstoffwechsel zu denken, der über eine Hypergastrinämie das Entstehen peptischer Ulcera induzieren könnte.

Da die Leber zwischen Gastrinbildungsstätte Antrum und Rezeptororgan Magenfundus liegt, beschäftigten sich eine Reihe von Arbeitsgruppen mit der Frage, welchen Einfluß die Pfortaderpassage auf die Wirkungen des Hormons nimmt und kamen dabei zum Teil zu widersprüchlichen Ergebnissen (GILLESPIE und GROSSMAN 1962; LICK, WELSCH, HART, BRÜCKNER, BALSER und GÜRTNER 1967; THOMPSON, REEDER, DAVIDSON, CHARTERS, BRÜCKNER, LEMMI und MILLER 1969; JAFFE und NEWTON 1969; McGUIGAN, JAFFE und NEWTON 1970; NEWTON und JAFFE 1971; TEMPERLY, WYLLIE und STAGG 1970; TEMPERLY, STAGG und WYLLIE 1971; BEGER 1973).

Eine Inaktivierung von Tetragastrin durch Leberhomogenat beschrieben LASTER und WALSH (1968). Bei Inkubation von synthetischem Tetragastrin und Leberhomogenat erfolgte eine Hydrolyse der C-terminalen Amidgruppe und damit eine Inaktivierung des Moleküls.

In der vorliegenden Arbeit sollen diese Probleme aufgegriffen werden. Da eine Inaktivierung von Pentagastrin und Gastrin nach Leberpassage nachgewiesen werden konnte (LICK, WELSCH, HART, BRÜCKNER, BALSER und GÜRTNER 1967; LeVEEN und BOREK 1969; THOMPSON, REEDER, DAVIDSON, CHARTERS, BRÜCKNER, LEMMI und MILLER 1969; BEGER 1973), und in vitro eine Desamidierung von Gastrin durch Leberhomogenate stattfindet (LASTER und WALSH 1968; SEELIG 1971), soll hier anhand chromatographischer und elektrophoretischer Untersuchungen der Abbau von Gastrin analysiert werden. Weiterhin soll untersucht werden, ob nach Leberschädigung eine merkbare Abbaustörung von Gastrin in vitro gemessen werden kann.

Tab. II: Struktur von Gastrin bei Mensch, Schwein, Schaf, Rind und Hund.

Spezies	Mol.-Gew. für			
	Gastrin			
	I	II		
Mensch ¹⁾	2096	2176	Glu-Gly-Pro-Tyr-Ileu-Glu-Glu-Glu-Glu-Ala-Tyr-Gly-Tyr-Met-Asp-Phe-NH ₂	
Schwein ²⁾	2114	2194	-Met-	
Schaf, Rind ³⁾	2024	2104	-Val-	
Hund ³⁾	2038	2118	-Met-	-Ala-

Literatur:

- | | | |
|-----|--|----------|
| (1) | BENTLEY, KENNER und SHEPPARD | { 1966 } |
| (2) | GREGORY, HARDY, JONES, KENNER und SHEPPARD | { 1964 } |
| (3) | GREGORY | { 1966 } |

B. Methoden

1. Gastrinherstellung

Die Extraktion von Gastrin I und II aus Schweineantra erfolgte in den Grundzügen der von GREGORY und TRACY (1964) angegebenen Methode. Der erste Arbeitsgang, die wässrige Extraktion und Anlagerung von Gastrin an Anionenaustauscher wurde nicht im Batch-Verfahren, sondern in einem von SEELIG (1971) entworfenen Durchlaufverfahren durchgeführt, das sich rationeller erwies.

120 - 150 Schweineantra wurden sofort nach Tötung der Tiere in kaltem Wasser gespült, in einem Fleischwolf zerkleinert und in 150 l Wasser 20 min gekocht. Der Extrakt wurde auf 20°C abgekühlt, mit 1 N NaOH auf pH 8,5 eingestellt, gefiltert und durch eine Säule mit 150 g DEAE-Zellulose gegeben (ausführliche Methodik vgl. SEELIG 1971). Die Durchflußgeschwindigkeit betrug 50 l/h. Die Zellulose wurde mit klarem Wasser gespült und mit 2,4 l 0,2 N NaOH 30 min eluiert. Nach Filtration wurde zur Vermeidung bakteriellen Wachstums Natriumacid zugegeben (Endkonzentration 0,02 %). Die Sedimentation der Proteine erfolgte über Nacht bei 2°C, pH 4,0. Das durch Zentrifugation gewonnene Sediment wurde bei - 18°C bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

Das gesammelte Sediment von ca. 500 Antra wurde mit Aqu.dest. auf 600 ml aufgefüllt und mit 18 N Ammoniak auf pH 10 eingestellt. Im Eisbad wurden 300 g Dikaliumhydrogenphosphat und 480 ml Isopropanol zugegeben. Nach 40 min wurde bei 2000 g (2°C) 10 min zentrifugiert. Die Isopropanolphase wurde abgesaugt und gesammelt. Die wässrige Phase wurde mit der oberen Phase eines Gemisches aus 200 ml Aqu.dest., 4 ml 18 N Ammoniak, 100 g Dikaliumhydrogenphosphat und 148 ml Isopropanol versetzt. Nach 20 min wurde die Lösung bei 2000 g (2°C) 10 min zentrifugiert, die Isopropanolphase abgesaugt und mit der ersten Isopropanolphase zusammengegeben. Die Isopropanolphase wurde mit dreifachem Volumen Diäthyläther und 100 ml Aqu.dest. extrahiert. Die wässrige Phase wurde ebenfalls mit dreifachem Volumen Diäthyläther extrahiert, bei 2000 g (2°C) 10 min

zentrifugiert und die Ätherphase abgesaugt. Das Isopropanol-Äthergemisch wurde mit 50 ml Aqu.dest. extrahiert. Die gesammelten wässrigen Phasen wurden 12 Stunden zur Entfernung des restlichen Äthers im offenen Luftstrom bei 20°C evaporiert.

Die Proteine der wässrigen Phase wurden bei pH 4 mit Eisessig gefällt und bei 2000 g abzentrifugiert. Das Sediment wurde in 30 ml Aqu.dest. und einigen Tropfen Ammoniak gelöst, wiederum mit Eisessig gefällt und abzentrifugiert, anschließend in 5 ml Aqu.dest. und einigen Tropfen Ammoniak gelöst. Die Lösung wurde auf Sephadex G 50 (2,5 x 100 cm) mit 0,04 M Ammoniumbicarbonat chromatographiert. Die Durchflußgeschwindigkeit betrug 10 ml/h und Fraktionen zu 5 ml wurden gesammelt, die mit dem ZEISS-Spektralphotometer PMQ II bei 280 nm in 0,5 cm Quarzküvetten auf ihren Proteingehalt untersucht wurden. Die Gastrinaktivität enthaltenden Fraktionen wurden zweimal zur Entfernung des Ammoniaks lyophilisiert.

20 mg des Rohgastrin enthaltenden Lyophilisates wurden in 0,02 M Ammoniumbicarbonat gelöst und auf eine mit dem Lösungsmittel äquilibrierte AE-Zellulosesäule (0,9 x 30 cm, WHATMAN) gegeben. Eluiert wurde mit einem Ammoniumbicarbonatgradienten der Form $C = C_2 - D \cdot x \cdot e^k$ (C = Konzentration des Elutionsmittels; C_2 = Differenz der anfänglichen Konzentration der Elutionsmittel: 0,18 M; D = Konzentration des Gradientenelutionsmittels: 0,2 M; k = Quotient aus Volumen der verbrauchten Eluatmenge und Volumen des niedermolekularen Elutionsmittels im Mischgefäß: 180 ml.) Bei Durchflußgeschwindigkeit von 5 ml/h wurden Fraktionen von 2,5 ml gesammelt. Nach Elution inerter Proteine wurde Gastrin I und II fast vollständig getrennt voneinander erhalten.

Die Gastrin I und II enthaltenden Fraktionen wurden dreimal lyophilisiert. Weitere Reinigung von Gastrin I und II erfolgte nochmals durch Gradienten-Chromatographie auf AE-Zellulose mit Ammoniumbicarbonat. Die Molarität des Ammoniumbicarbonates betrug zu Beginn der Elution für Gastrin I 0,05 M,

für Gastrin II 0,06 M. Für die Herstellung des Gradienten wurde bei Gastrin I 0,2 M, bei Gastrin II 0,3 M Ammoniumbicarbonat verwendet. In beiden Fällen betrug die Durchflußgeschwindigkeit 10 ml/h. Fraktionen zu 5 ml wurden gesammelt.

Gastrin I und II erschienen als scharf abgegrenzte Proteinfractionen. Die zentralen Partien wurden gesammelt und zur weitgehenden Entfernung des Ammoniumbicarbonates mehrfach lyophilisiert.

Es folgte eine hochspannungselektrophoretische Reinigung⁺ der beiden Gastrine (vgl. SEELIG 1971). Das so erhaltene Schweinegastrin I und II wurde für die Untersuchungen verwandt.

⁺Die Reinigung wurde von SEELIG durchgeführt.

2. Untersuchungen über den Abbau von Gastrin II

a) Herstellung von partikelfreien Überständen aus Leberhomogenat.

Nüchternen Ratten wurde die Leber entnommen, in steriler, eiskalter physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und auf Fließpapier getrocknet. Nach Feststellung des Gewichtes wurde das Gewebe mit doppeltem Anteil physiologischer NaCl-Lösung (Gewicht/Volumen) versetzt.

Die Homogenisierung der Lebergewebe wurde mit dem SORVALL-Omnimixer bei 14.000 UPM (Eisbad, im Wechsel 10 x 1 Minute Homogenisieren, 1 Minute Pause) durchgeführt. Die vollständige Homogenisierung wurde mit dem Mikroskop überprüft.

Zur Abtrennung großer Partikel wurde das Homogenat in der Kühlzentrifuge bei 1000 g 20 Minuten, der Überstand anschließend in der Ultrazentrifuge (+2°C) bei 104.000 g 60 Minuten zentrifugiert. Der erhaltene partikelfreie Überstand wurde 7 Stunden gegen 4 l physiologische NaCl-Lösung dialysiert (Dialysierschläuche VISKING 7 mm Ø, 0,05 mm Wandstärke).

Anschließend wurde in Ampullen abgefüllt und bei -30°C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert. Alle Geräte wurden im Autoklaven (134°C, 2 atü) 30 Minuten sterilisiert. Die Arbeiten wurden im Kühlraum bei +2°C oder im Eisbad verrichtet.

b) Chromatographische Untersuchungen

Inkubate von Gastrin und partikelfreiem Überstand wurden auf eine mit 0,06 M Phosphatpuffer pH 6,4 äquilibrierte Säule Sephadex G 25 (0,9 x 30 cm) aufgetragen und mit gleichem Puffer bei konstanter Durchflußgeschwindigkeit von 5,8 ml/h eluiert. Das Eluat wurde in einer MRD-1-Mikrodurchflußküvette (Schichtdicke 0,5 cm) von einem mit Küvettenautomatik ausgerüsteten Zeisspektralphotometer PMQ II bei 280 nm kontinuierlich auf seinen Eiweißgehalt untersucht. Die Transmission

wurde von einem Kompensationsschreiber (Servogor) registriert. Alle 7 Minuten erfolgte die Nullpunktkontrolle gegen Luft. Nach jedem Versuch wurde die Säule 8 Stunden mit Phosphatpuffer eluiert.

1. Die Säuleneichung: 150 μ l partikelfreier Überstand aus Rattenleberhomogenat (Eiweißgehalt 3,899 g/ 100 ml Homogenat, Methode nach KJELDAHL) wurden mit 450 μ l 0,132 M Phosphatpuffer pH 6,4 verdünnt. 300 μ l der Verdünnung wurden zur Festlegung des Proteingipfels chromatographiert. Im zweiten Lauf wurden 150 nMol Gastrin II in 300 μ l physiologischer NaCl-Lösung chromatographiert.
2. Hierauf wurden Gastrin II (150 nMol in 150 μ l Saline gelöst) und partikelfreier Überstand (150 μ l, 1:2 mit 0,132 M Phosphatpuffer verdünnt) zusammen auf die Säule aufgetragen (0-Stundeninkubat) und chromatographiert. Auf diese Art wurden Inkubate von 1, 2 und 5-stündiger Inkubationsdauer bei 37°C chromatographiert.
3. Ein hitzeinaktivierter Überstand (60°C, 60 min) wurde 5 Stunden bei 37°C mit Gastrin II inkubiert und chromatographiert.

Die bei der chromatographischen Auftrennung erhaltenen Fraktionen wurden in sterilen Ampullen gesammelt und lyophilisiert. Das erhaltene Lyophilisat wurde zur Entsalzung in 200 μ l 0,04 M Ammoniumbicarbonat gelöst und auf eine Sephadex G 10 Säule (0,9 x 30 cm), die mit gleichem Lösungsmittel äquilibriert war, aufgetragen. Die Elutionsgeschwindigkeit betrug 7 ml/h. Die Messung erfolgten an der gleichen Einrichtung wie oben.

Tabelle III: Übersicht über Inkubate, erhaltene Fraktionen und über die zur Hochspannungselektrophorese-Untersuchungen entsalzten Fraktionen.

Inkubate	Inkubations- zeit in h	Fraktionen der G 25 Säule	Fraktionen der G 10 Säule
1. Gastrin II allein	0	Säuleneichung	-
2. Überstand allein	0	Säuleneichung	-
3. Überstand + Gastrin II	0	I	I
4. Überstand + Gastrin II	1	I, III	I
5. Überstand allein	1	I	-
6. Überstand + Gastrin II	2	I, II, III	I
7. Überstand allein	2	III	-
8. Überstand + Gastrin II	5	II, III	III
9. Überstand allein	5	II, III	-
10. Überstand inaktiviert + Gastrin II	5	I	I

Die erhaltenen Proteingipfel (s. Tab. III) wurden gesammelt, zur Entfernung des Ammoniumbicarbonates dreimal lyophilisiert und standen jetzt salzfrei für die hochspannungselektrophoretischen Untersuchungen zur Verfügung.

c) Hochspannungselektrophoretische Untersuchungen

Die bei den chromatographischen Untersuchungen erhaltenen Fraktionen wurden in 150 μ l Aqu.tridest. gelöst und punktförmig in Portionen zu 25 μ l auf Schleicher-Schüll-Papier MB 261 aufgetragen. Die Elektrophoresen (CAMG-Hochspannungselektrophorese) wurden mit Pyridin-Eisessig-Wasser (100:4:900) pH 6,3 bei einem Spannungsgradienten von 62,5 V/cm durchgeführt. Die Laufzeit betrug 90 min. Die Pherogramme wurden unter dem Abzug getrocknet und mit Chloriminoreagenz angefärbt (Methode nach RYDON und SMITH 1952).

Es wurde untersucht:

1. Gastrin II 0 h mit partikelfreiem Überstand inkubiert (C).
2. Gastrin II 1 h mit partikelfreiem Überstand inkubiert (D).
3. Gastrin II 2 h mit partikelfreiem Überstand inkubiert (E).

Kontrollen:

4. natives Gastrin II (A).
 5. Gastrin II 5 h mit hitzeinaktiviertem partikelfreiem Überstand inkubiert (B).
- 3) Die Desamidierung von Gastrin nach Leberschädigung durch Tetrachlorkohlenstoff

a) Schädigungsmodus

32 männlichen Whistarratten wurde ein Leberlappen entnommen: Eröffnung des Abdomen in Äthernarkose durch einen 2 cm langen Mittelschnitt. Ligatur des vorderen Leberlappens und Entnahme. Peritonealnaht, Muskelnah, Hautnaht. Die entnommenen Leberlappen wurden jeweils in Formalin und in der Tiefkühltruhe (-90°C) asserviert.

Nach einer Regenerationszeit von 20 Tagen erhielt jedes Tier 5 mal/Woche 1 μ l CCl_4 / g Körpergewicht subcutan. Auf diese

Weise wurden geschädigt:

- 7 Tiere 5 Tage,
- 9 Tiere 10 Tage,
- 1 Tier 16 Tage,
- 2 Tiere 20 Tage,
- 9 Tiere 22 Tage und
- 4 Tiere 27 Tage.

Die Tiere einer Gruppe wurden 2 Tage nach der letzten Injektion getötet und die Lebergewebe wie oben asserviert. Mikrophotogramm einer 27 Tage geschädigten Leber siehe Seite 30.

b) Homogenate und NH_3 -Bestimmung

Die Herstellung der Homogenate erfolgte mit dem Homogenisator nach POTTER und ELVEHJEM im Eisbad. Die Umdrehung des Pistill betrug 250 UPM. Die vollständige Homogenisierung wurde mit dem Mikroskop überprüft.

In einem Arbeitsgang wurden gesunde und geschädigte Probe vom gleichen Tier aufgearbeitet. Die eingefrorenen Leberproben wurden im Kühlraum ($+2^\circ\text{C}$) aufgetaut, mit dem scharfen Skalpell zerkleinert, gewogen und mit doppeltem Anteil 0,2 M Tris-HCl-Puffer pH 8,2 (Gew./Vol.) versetzt. Darauf erfolgte die Homogenisierung. Zur Abtrennung von Kernen und Zelltrümmern wurde das Homogenat in der Kühlzentrifuge bei 1000 g 20 Minuten, der Überstand anschließend in der Ultrazentrifuge ($+2^\circ\text{C}$) bei 104.000 g 60 Minuten zentrifugiert. Der erhaltene Überstand wurde zur Entfernung des endogenen Ammoniaks in Dialysierschläuchen (VISKING 7 mm ϕ , 0,05 mm Wandstärke) 5 Stunden gegen 4 Liter Tris-HCl-Puffer dialysiert. Zur Vermeidung von bakteriellem Wachstum enthielt der Tris-Puffer 0,02 % Natriumacid.

Für die quantitative Bestimmung des bei der enzymatischen Hydrolyse der C-terminalen Amidgruppe von Gastrin freigesetzten Ammoniaks wurde die von SCHMIDT und SCHWARZ (1966) angegebene Methode der enzymatischen Blutammoniakbestimmung, die von SEELIG (1971) für die Bedürfnisse hier modifiziert war, angewandt.

Der Inkubationsansatz:

100 nMol Substrat in 100 μ l physiologischer NaCl-Lösung +
100 μ l partikelreicher Überstand 1:1 mit 1/7,5 M Phosphat-
puffer pH 6,4 versetzt. Inkubationsdauer 60 min bei 37°C.

C. Ergebnisse

1. Hydrolyse von Gastrin II durch partikelfreie Überstände von Rattenleberhomogenat

Zur Analyse des Gastrinabbaus in der Leber wurden Inkubate von Gastrin II und partikelfreiem Überstand aus Leberhomogenaten auf Sephadex G 25 nach 0,1,2 und 5 Stunden Inkubationszeit aufgetrennt.

Säuleneichnungen und Kontrolle:

Der zur Säuleneichnung aufgetragene partikelfreie Überstand erscheint zum überwiegenden Teil als hochmolekulare einheitliche Fraktion (Ü) im Diagramm; einige niedermolekulare Bestandteile werden später eluiert und stören nicht die weiteren Untersuchungen (Abb. 2).

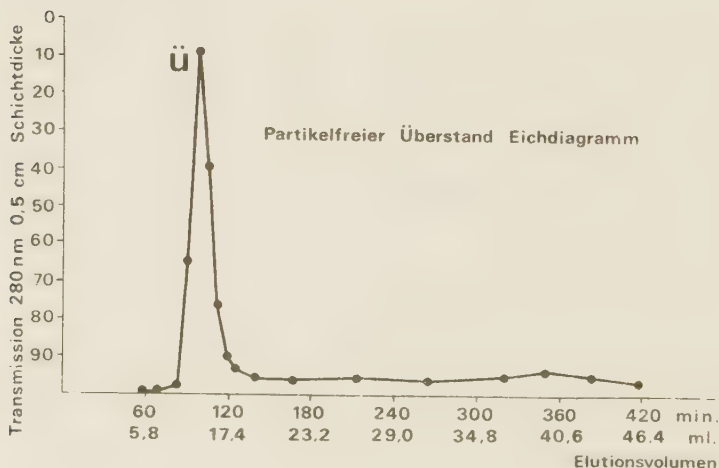


Abb. 2: Chromatographie auf Sephadex G 25 (0,9 x 30 cm) Phosphatpuffer pH 6,4
150 μ l partikelfreier Überstand aus Rattenleberhomogenat, EW-Gehalt: 3,899 g % in 0,132 M Phosphatpuffer pH 6,4.
300 μ l 1:3 aufgetragen. Eichdiagramm.

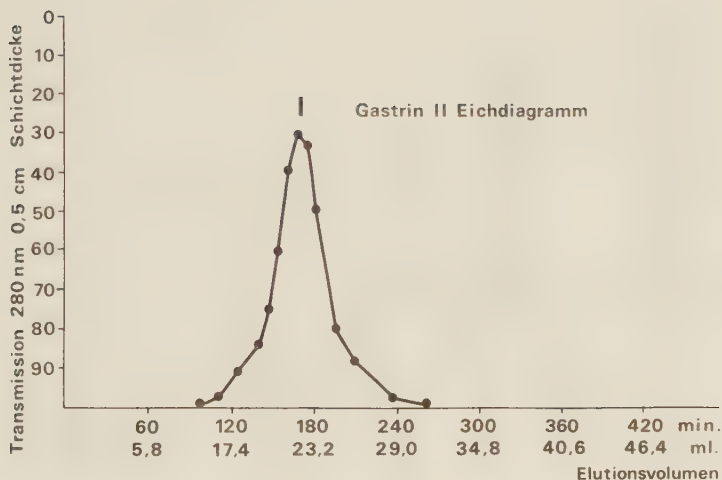


Abb. 3: Chromatographie auf Sephadex G 25 (0,9 x 30 cm) Phosphatpuffer pH 6,4.
150 nMol Gastrin II in 300 μ l physiologischer NaCl-Lösung. Eichdiagramm.

Wird Gastrin II aufgetragen, so erscheint es als einheitliche Fraktion (I) zeitlich später als der Überstand (Ü).

Werden Gastrin II und partikelfreier Überstand gemischt und sofort zusammen aufgetragen (0-Stundeninkubat), so erscheint die Gastrinfraktion (I) in gleicher Form und gleichem zeitlichen Abstand wie in dem Eichdiagramm (Abb. 4). Hierbei läßt sich der Überstandspeak (Ü) vollständig vom Gastrinpeak (I) abtrennen.

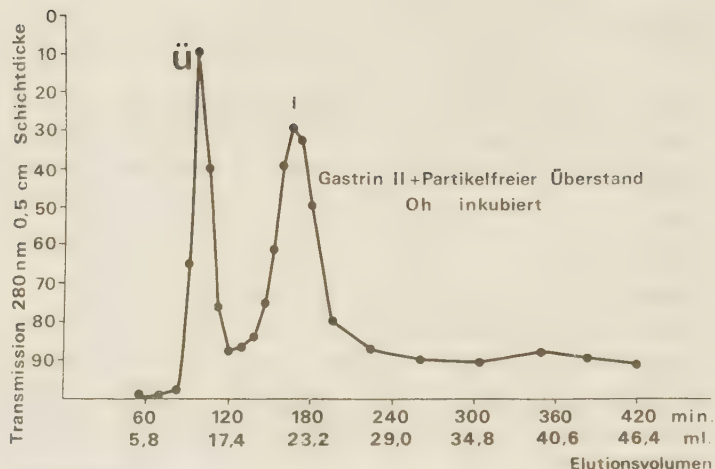


Abb. 4: Chromatographie auf Sephadex G 25 (0,9 x 30 cm)
 Phosphatpuffer pH 6,4
 150 nMol Gastrin II in 150 μ l physiologischer
 NaCl-Lösung +
 150 μ l partikelfreier Überstand, 1:2 mit 0,132 M
 Phosphatpuffer. 0-Stundeninkubat.

Ein gleiches Elutionsdiagramm wird erhalten, wenn Gastrin II
 5 Stunden mit inaktivem Überstand (60°C, 60 min) inkubiert
 wurde (Abb. 5). Hierbei werden geringfügig mehr nieder-
 molekulare Bestandteile eluiert, die wahrscheinlich aus dem
 partikelfreien Überstand stammen.

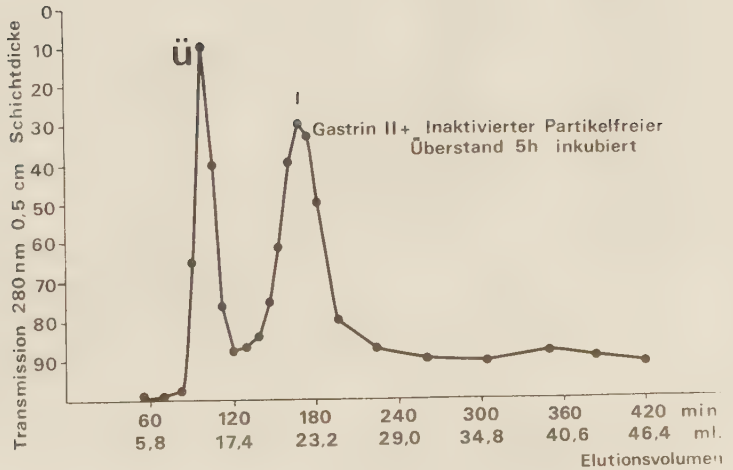


Abb. 5: Chromatographie auf Sephadex G 25 (0,9 x 30 cm)
Phosphatpuffer pH 6,4

150 nMol Gastrin II in 150 ml physiologischer
NaCl-Lösung +

150 μ l inaktivierter partikelfreier Überstand
(60°C, 60 min), 1:2 mit 0,132 M Phosphatpuffer.
5-Stundeninkubat.

Ergebnisse nach 1 h-Inkubation

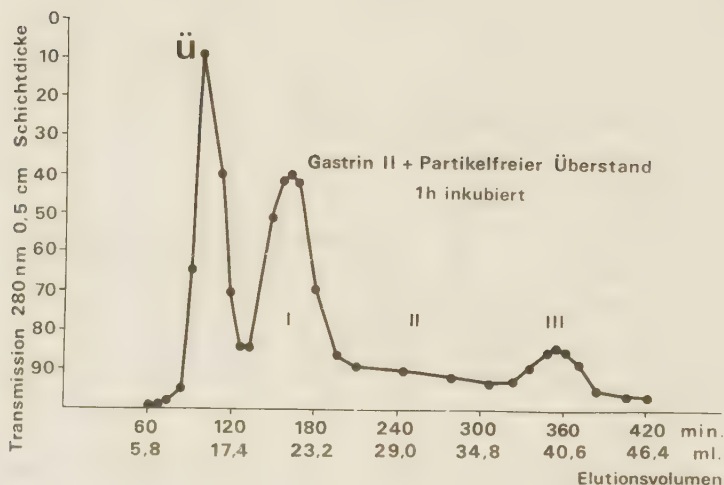


Abb. 6: Chromatographie auf Sephadex G 25 (0,9 x 30 cm)
Phosphatpuffer pH 6,4
150 nMol Gastrin II +
150 µl partikelfreier Überstand.
1-Stundeninkubat. pH 6,4 37°C.

Nach einstündiger Inkubation war der im Bereich des Gastrin-
eichpeak liegende Peak (I) deutlich vermindert, und zwei
niedermolekulare Spaltprodukte darstellende Peaks (II und
III) wurden zeitlich später eluiert (Abb. 6).

Das als Kontrolle aufgezeichnete Diagramm des gleich lang
allein inkubierten Überstandes zeigt das gleiche Bild wie
im Eichdiagramm (Abb. 2), lediglich in Höhe der Fraktionen
II und III zwei kleine Peaks als Folge der Inkubation.

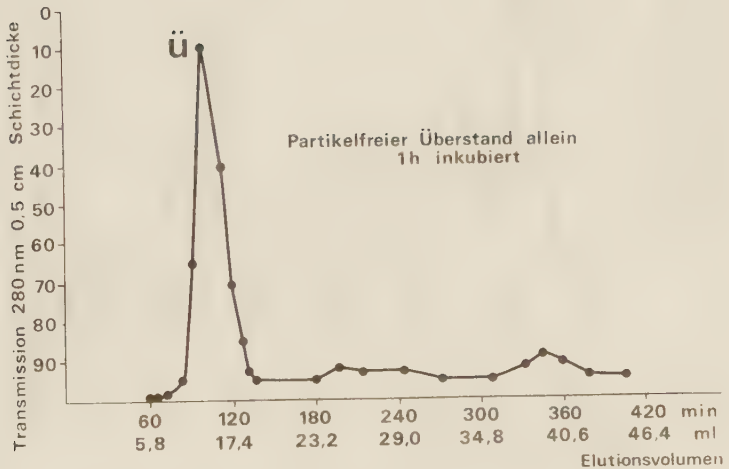


Abb. 7: Chromatographie auf Sephadex G 25 (0,9 x 30 cm)
Phosphatpuffer pH 6,4
150 μ l partikelfreier Überstand, 1:2 mit 0,132 M
Phosphatpuffer. pH 6,4 37°C 60 min
Kontrolle des 1-Stundeninkubates.

Ergebnisse nach 2 h-Inkubation:

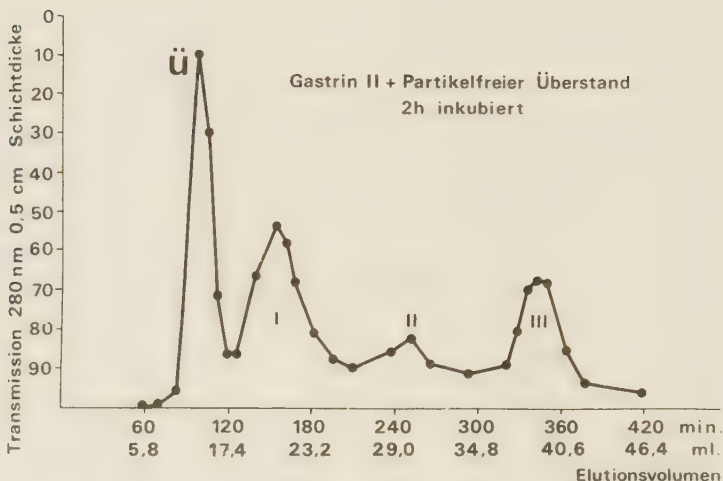


Abb. 8: Chromatographie auf Sephadex G 25 (0,9 x 30 cm)
Phosphatpuffer pH 6,4
150 nMol Gastrin II +
150 μ l partikelfreier Überstand.
2-Stundeninkubat. pH 6,4 37°C

Nach zweistündiger Inkubation nahm der Gastrinpeak (I) ab,
und die Fraktionen II und III nahmen entsprechend zu (Abb. 8).
Das als Kontrolle aufgezeichnete Diagramm des gleich lang
allein inkubierten Überstandes zeigt das gleiche Bild wie im
Eichdiagramm (Abb. 2).

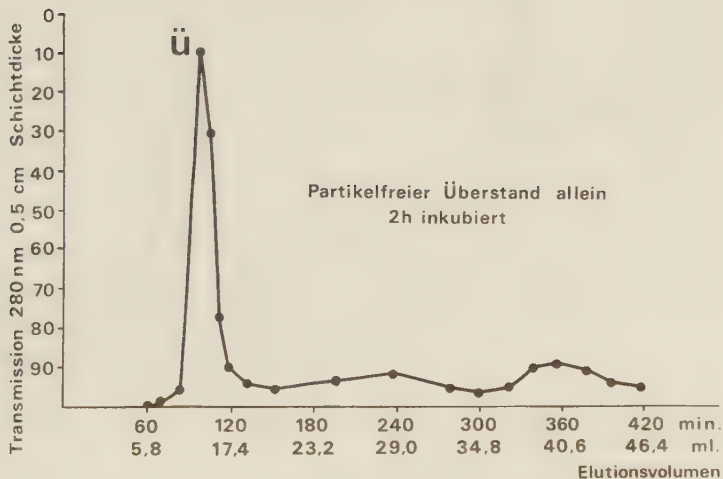


Abb. 9: Chromatographie auf Sephadex G 25 (0,9 x 30 cm)
Phosphatpuffer pH 6,4
150 μ l partikelfreier Überstand, 1:2 mit 0,132 M
Phosphatpuffer. pH 6,4 37°C 120 min
Kontrolle des 2-Stundeninkubates.

Ergebnisse nach 5 h-Inkubation:

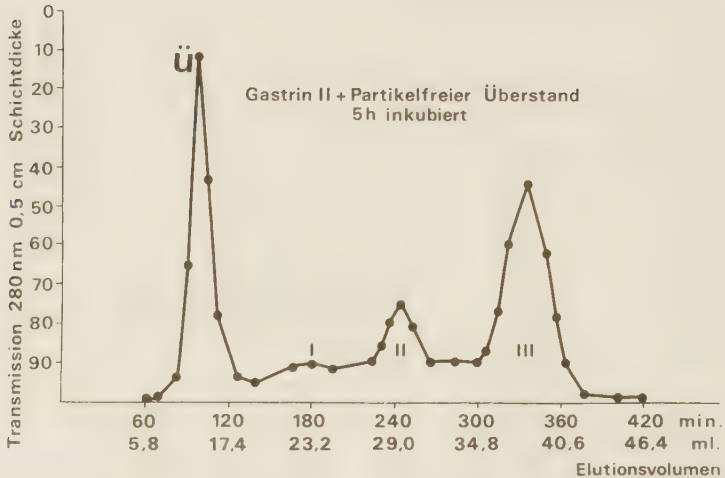


Abb. 10: Chromatographie auf Sephadex G 25 (0,9 x 30 cm)
Phosphatpuffer pH 6,4
150 nMol Gastrin II +
150 μ l partikelfreier Überstand.
5-Stundeninkubat. pH 6,4 37°C

Nach fünfstündiger Inkubation konnte an der Stelle des Eich-peaks kein Gastrin nachgewiesen werden. Dafür wurden vermehrt niedermolekulare Spaltstücke eluiert, was sich an den zunehmenden Peaks II und III zeigte (Abb. 10). Die Kontrolle zeigte das gleiche Bild wie oben.

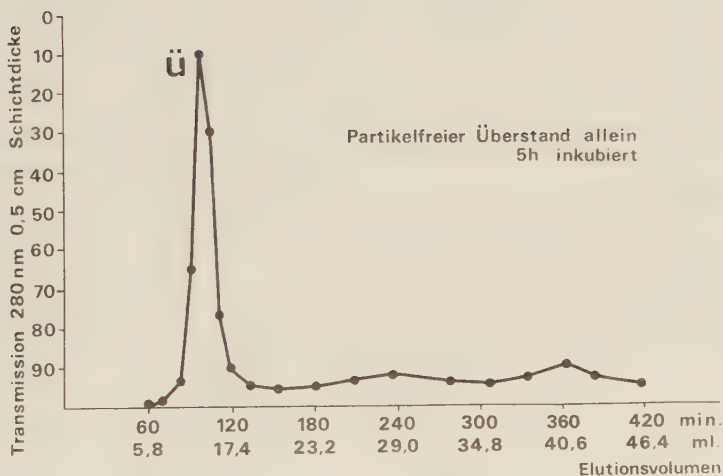


Abb. 11: Chromatographie auf Sephadex G 25 (0,9 x 30 cm)
Phosphatpuffer pH 6,4
150 µl partikelfreier Überstand, 1:2 mit 0,132 M
Phosphatpuffer. pH 6,4 37°C 300 min
Kontrolle des 5-Stundeninkubates.

Die erhaltenen Peaks wurden nach Lyophilisieren auf Sephadex G 10 rechromatographiert. Hierbei wurde der Gastrinpeak I bei allen Inkubationszeiten als einheitliche Fraktion vorgefunden. Eine Hydrolyse im Molekülzentrum hat demnach offensichtlich nicht stattgefunden; selbst nach zweistündiger Inkubation lagen Moleküle mit annähernd gleichem Molekulargewicht vor.

Die Fraktion der niedermolekularen Bruchstücke (III) ließ sich nach fünfständiger Inkubation in 4 Unterfraktionen mit unterschiedlichem Molekulargewicht auftrennen (Abb. 12).

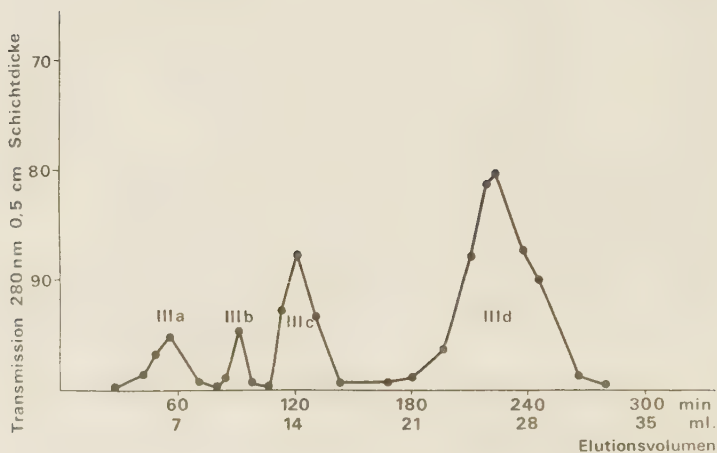


Abb. 12: Chromatographie auf Sephadex G 10 (0,9 x 30 cm)
Phosphatpuffer pH 6,4

Rechromatographie der Fraktion III nach fünfstündiger Inkubation von Gastrin II mit partikelfreiem Überstand (s. Abb. 10). Es lassen sich vier Unterfraktionen a, b, c und d mit unterschiedlichem Molekulargewicht nachweisen.

2. Hochspannungselektrophoretische Auftrennung der Gastrinfraktionen

Die Gastrinfraktion, die fünf Stunden mit inaktivem Überstand inkubiert wurde, hat im Elektropherogramm (Abb. 13) die gleiche Wanderungsgeschwindigkeit wie natives Gastrin II. Beim 0-Stundeninkubat trennte sich eine kleine Fraktion mit größerer anodischer Mobilität vom Hauptteil der Gastrinfraktion.

Nach einstündiger Inkubation findet sich lediglich eine kleinere Gastrin-II-Fraktion; der größere Teil wandert schneller anodisch. Diese Fraktion entspricht der schneller wandernden Fraktion vom 0-Stundeninkubat.

Nach zweistündiger Inkubation finden sich im Elektropherogramm zwei voneinander scharf abgetrennte Fraktionen; die erste, langsamer anodisch wandernde Fraktion, entspricht dem Hauptteil des 1-Stundeninkubates, die zweite Fraktion besitzt noch größere anodische Mobilität. Freie Aminosäuren lassen sich auf dem Elektropherogramm mit Ninhydrin nicht nachweisen.

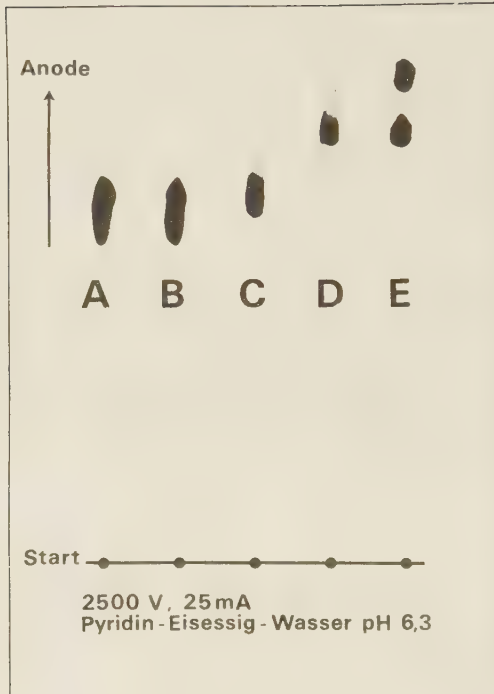


Abb. 13: Hochspannungselektrophoretische Auftrennung der Gastrinfraktion nach Inkubation mit Leberzellüberstand.

- A: Natives Gastrin II.
- B: Gastrin II mit hitzeinaktiviertem Überstand 5 h inkubiert.
- C: Gastrin II 0 Stunden inkubiert.
- D: Gastrin II 1 Stunde inkubiert.
- E: Gastrin II 2 Stunden inkubiert.

3. Amidhydrolyse von Gastrin I durch normale und CCl_4 -geschädigte Rattenlebern

Die bei der enzymatischen Hydrolyse der C-terminalen Amidgruppe entstehende Ammoniakfreisetzung aus Gastrin I durch partikelfreien Überstand wurde im gekoppelten optischen Test gemessen. Probe A bestand aus dem Überstand gesunder Rattenleber, Probe B aus Überstand von 27 Tage CCl_4 -geschädigter Leber. Probe A und B stammten vom gleichen Tier. Als Substrateinsatz waren 100 nMol Gastrin I in 100 μl Saline gelöst. Um im pH-Optimum der spezifischen Amidase zu arbeiten, wurden die partikelfreien Überstände 1:2 mit 1/7,5 M Phosphatpuffer pH 6,4 verdünnt. Die Meßwerte:

Lfd.Tier-Nr.	NH_3 -Abspaltung in nMol	NH_3 -Abspaltung in Prozent
2 A	24,35	100,00
2 B	10,27	42,09
3 A	16,98	100,00
3 B	14,97	88,16
4 A	16,31	100,00
4 B	10,27	62,96

Es wurden die Proben A und B der am längsten mit CCl_4 geschädigten Tiere zuerst untersucht. Dabei zeigten Probe A wie Probe B eine geringe NH_3 -Abspaltung. Nach den Ergebnissen der Voruntersucher (SEELIG 1971) entsprechen die gemessenen Werte der NH_3 -Abspaltung für die Kontrollen (Probe A) nicht dem zu erwartenden Desamidierungsvermögen von partikelfreiem Überstand. Aus diesem Grund wurden die restlichen 72 Proben nicht mehr untersucht.

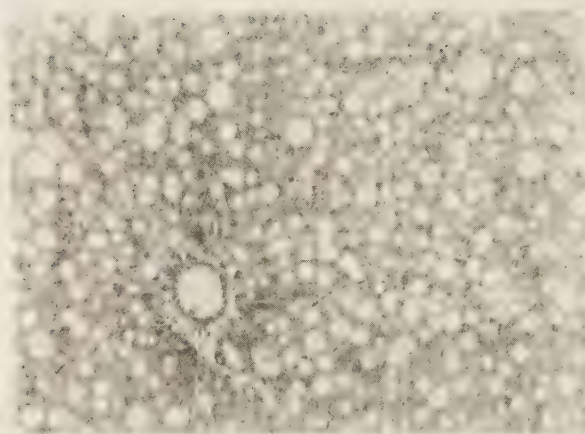


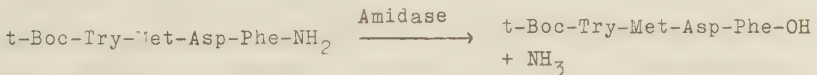
Abb. 14: CCl_4 -geschädigte Rattenleber (Verg. 160 fach)
Dosis 1 ml/ g Körpergewicht s.c. 27 Tage

Es handelt sich um eine diffuse grobtropfige Verfettung
fast sämtlicher Leberzellen.

D. Diskussion

Die vorliegenden Untersuchungen zeigen, daß Lebergewebe von Ratten Hydrolasen enthält, die Gastrin in niedermolekulare Fragmente zerlegen. Der 1. Schritt zum Abbau des Hormons besteht in der Desamidierung durch eine Amidase mit pH-Optimum bei pH 6,4, welche die Hydrolyse der C-terminalen Amidgruppe katalysiert (SEELIG 1971). Mit dem Verlust der terminalen Amidgruppe verliert das Hormon seine physiologischen Wirkungen (MORLEY, TRACY und GREGORY 1965; MORLEY 1968). Nach dem Schritt der Inaktivierung erfolgt der Abbau des Hormons: Das entstandene Desamidogastrin wird in Abhängigkeit von der Inkubationszeit durch Hydrolasen im partikelfreien Überstand von Lebergewebe in niedermolekulare Bruchstücke gespalten.

Den Nachweis einer enzymatischen Desamidierung von Gastrin wirkungsanalogem Tetragastrin (t-Boc-Try-Met-Asp-Phe-NH₂) durch Gewebshomogenate beschrieben LASTER und WALSH 1968. Nach Inkubation von Gewebshomogenaten mit Tetrapeptid-Amid als Substrat wiesen sie halbquantitativ mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie die Aktivität einer Amidase nach, die die Reaktion



katalysierte. Als zusätzlichen Beweis zeigten sie, daß Carboxypeptidase A vom t-Boc-Tetrapeptid, das der Einwirkung der Amidase ausgesetzt war, Phenylalanin abspalten konnte. Ohne Anwesenheit der Amidase fand dieser Effekt nicht statt. Das pH-Optimum der Reaktion beschrieben sie mit 6,7. Bei Untersuchungen verschiedener Gewebe wurden die höchsten Enzymaktivitäten in Leber, Niere und Dünndarm gefunden.

SEELIG, LINTHE und MÜLLER (1973) fanden in 18 Stunden dialysiertem partikelfreien Überstand von Rattenlebern die Anwesenheit einer Amidase mit pH-Optimum 8,2. Nach 6 stündiger Dialyse wurde eine Amidase gefunden, die eine wesentlich höhere Aktivität gegenüber Gastrin besaß. Das pH-Optimum lag bei 6,4, also in der Nähe der von LASTER und WALSH beschriebenen Amidase.

Bei längerer Einwirkung dieser spezifischen Amidase auf das Gastrinmolekül wurde aus Inkubaten mehr NH_3 freigesetzt, als aus der eingesetzten Substratmenge stammen konnte; hier war nicht nur eine Desamidierung von Gastrin eingetreten, sondern das entstandene Desamidogastrin mußte weiter hydrolysiert worden sein (s. Tab. IV).

Tab. IV: Unspezifische und spezifische Amidaseaktivität
(nach SEELIG 1971)

Ansatz: 2,7⁺ bzw. 3,8 mg Enzymprotein · 100 nMol
Substrat in 200 µl Puffer

Substrat	pH-Optimum	Umsatzrate bei Inkubation von		
		30 Min	60 Min	90 Min
<u>Unspezifische Amidase⁺</u>				
Gastrin II	8,2	13 %	15 %	18 %
Pentagastrin	8,2	78 %	90 %	-
<u>Spezifische Amidase</u>				
Gastrin II	6,4	60 %	92 %	> 100 %

TEMPERLEY, STAGG und WYLLIE (1971) untersuchten in vivo und in vitro den Katabolismus von Gastrin nach Pfortaderpassage. In vitro fanden sie eine Inaktivierung von synthetischem

Humangastrin durch Lebergewebe. Doch betrug die Inaktivitätsrate lediglich 0,04 nMol Gastrin/Min/mg Gewebsprotein aus partikelfreien Überständen von Rattenlebern. Pentagastrin hingegen verlor bei den Untersuchungen seine säurestimulierende Wirkung, die im bioassay nach SMITH, LAWRENCE, COLIN-JONES und SCHILD (1970) gemessen wurde. Da jedoch die Untersuchungen bei zu kurzen Inkubationszeiten und zu geringen Substratkonzentrationen vorgenommen wurden, konnten hier keine hohen Inaktivitätsraten für Gastrin erreicht werden.

Bei Infusionen von Gastrin in die obere Mesenterialarterie wurde eine signifikante Minderung von 37 % der Säurestimulation gegenüber Infusionen in die Jugularvene gefunden. Bei Infusionen in die Pfortader fand sich eine leichte Zunahme der Säuresekretion verglichen mit Applikation in die Jugularvene. Dünndarmhomogenate bauten bei diesen Untersuchungen Gastrin 22-fach stärker ab als Leberhomogenate. Daraus schlossen TEMPERLY, STAGG und WYLLIE, das Humangastrin I im Dünndarm und nicht in der Leber abgebaut wird.

Die Beobachtung, daß bei Inkubationen von Gastrin und partikelfreiem Überstand mehr NH_3 freigesetzt wurde als aus dem C-terminalen Amid stammen konnte, veranlaßte die vorliegenden Untersuchungen. Dabei wurden die Inkubate chromatographisch und elektrophoretisch aufgetrennt. Es wurde mit hohen Substrat- und Enzymmengen gearbeitet. Der Ansatz betrug 150 nMol Gastrin II · 150 μl partikelfreier Überstand, und es wurde im pH-Optimum der spezifischen Amidase gearbeitet. Das Substrat lag als reines Gastrin II (Schweinegastrin) vor. Dabei wurde im Verlauf einer 5-stündigen Inkubation alles eingesetzte Substrat inaktiviert und in kleinere Peptidbruchstücke hydrolysiert. Schon nach einer Stunde lag ca. 80 % des eingesetzten Gastrin II als Desamidogastrin vor. Da im Chromatogramm freie Aminosäuren nicht eluiert wurden, erfolgt der hydrolytische Abbau von Desamidogastrin nicht sukzessive vom C-terminalen Ende, sondern das Molekül wird von Peptidasen in Oligopeptide, wahrscheinlich

Di- und Tripeptide, hydrolysiert. Die oben beschriebene Freisetzung von Ammoniak wird jetzt durch Einwirkung von Aminosäureoxydasen auf die Bruchstücke erfolgen. Eine genauere Analyse der Bruchstücke konnte wegen der geringen Substanzmenge nicht vorgenommen werden.

Das Ergebnis dieser Untersuchungen stimmt mit den Beobachtungen von LICK, WELSCH, HART, BRÜCKNER, BALSER und GÜRTNER (1967); LeVEEN und BOREK (1969); THOMPSON, REEDER, DAVIDSON, CHARTERS, BRÜCKNER, LEMMI und MILLER (1969) und BEGER (1973) überein. THOMPSON, REEDER, DAVIDSON, CHARTERS, BRÜCKNER, LEMMI und MILLER hatten im Radioimmunoassay die Portalvenen- und Lebervenenkonzentration von Gastrin gemessen und eine 46 %ige Abnahme nach Leberpassage festgestellt. Mindestens eine Desamidierung muß hier erfolgt sein, denn nach McGUIGAN und THOMAS (1972) verliert das Heptadekapeptid nach Desamidierung zu 99 % seine Immunreaktivität.

BEGER (1973) applizierte reines Schweinegastrin in den Hauptstrom der Pfortader und fand eine Minderung der gastrinstimulierten Sekretion um 33,4 %. Wurde Gastrin in eine Segmentvene der Vena portae appliziert, so betrug die Minderung 2,2 %. Diese Untersuchungen wurden erstmals am Menschen mit reinem Schweinegastrin vorgenommen. Bei Patienten mit Leberzirrhose war das Inaktivierungsvermögen für Gastrin eingeschränkt (BEGER 1971). ISHIMORI, NEMOTO, SHIMOYAMA und JAMAGATA (1971) verglichen die Inaktivierung von Tetragastrin nach intraportaler Infusion bei CCl_4 -geschädigten Ratten und gesunden Tieren und fanden ein eingeschränktes Inaktivierungsvermögen bei den lebergeschädigten Tieren.

Bei den vorliegenden in vitro Untersuchungen sollte das Inaktivierungsvermögen von Rattenlebern gegenüber Gastrin vor und nach experimenteller Schädigung überprüft werden. Als Noxe wurde CCl_4 gewählt, das als klassisches Leberzellgift gilt. Die CCl_4 -Intoxikation verursacht zentrale Läppchennekrosen durch "dysenzymatische Hypoxydase" (BÜCHNER 1957). Der Nekrose geht eine zentral nach peripher ausstrahlende Läppchenverfettung voraus. Nach Metabolisierung durch mikrosomale Stoffwechsel-

systeme (McLEAN und McLEAN 1966) erhält CCl_4 seine toxischen Wirkungen. Infolge der Lipoidlöslichkeit von CCl_4 sind Membranschädigungen zu erwarten (SIEBERT 1968), es kommt zum Anstieg der Serumenzyme (KRÖNER und STAIB 1967) und eine massive Hemmung der Proteinsynthese ist bekannt (SMUCKLER und BENDITT 1965).

Bei den Messungen des Desamidierungsvermögens wurden die am längsten geschädigten Proben zuerst untersucht. Proben wie Kontrollen zeigten eine geringe NH_3 -Abspaltung. Bei einem Substrateinsatz von 100 nMol Gastrin I hätte bei dem vorliegenden Reaktionsansatz (Ansatz: 100 nMol Substrat · 100 µl partikelfreier Überstand, 1 h bei 37°C, pH 6,4), zumindest bei den Kontrollen, mit einer ca. 90 % Desamidierungsrate des Substrats gerechnet werden müssen. Dieser Aktivitätsverlust der Amidase ist wahrscheinlich auf die Abnahme der Enzymaktivität durch die lange Lagerung zurückzuführen. Aus technischen Gründen war es nicht möglich, sofort nach Probengewinnung die Messungen durchzuführen, so daß sie bis zu 100 Tage bei -90°C gelagert werden mußten. Die bei den geschädigten Leberproben gemessenen Werte lassen jedoch ein vermindertes Desamidierungsvermögen vermuten.

Während bei den hier vorliegenden Untersuchungen die eingeschränkte Inaktivierung von Gastrin bei geschädigtem Leberparenchym als ein Faktor betrachtet wird, der zur Ulcuskrankheit beiträgt, ging JAHN (1946) von der Vorstellung aus, daß die toxischen Schädigungen der Magen- und Duodenalschleimhaut durch giftig wirkende Abbauprodukte im Eiweißstoffwechsel der pathologisch-anatomisch veränderten Leber verursacht werden (BAUR 1949). Das gehäufte Auftreten von peptischen Ulcera bei Leberzirrhose veranlaßte JAHN vom "hepatogenen Ulcus" zu sprechen. Die klinische Beobachtung Leberschaden - Ulcus wird von vielen Autoren bestätigt (SWISHER, BAKER und BENNETT 1955; STALLZNER 1969; SCHRIEFERS, SCHREIBER und ESSER 1963; ORLOFF, CHANDLER, ALDERMAN, KEITER und ROSEN 1969; ALDERMAN, KEITER, CHANDLER, ROSEN und ORLOFF 1969).

Bei 1408 Leberzirrhosen aus 38.386 Sektionsfällen konnte eine

Ulcuskoinzidens von 17,2 % festgestellt werden (SEELIG 1971). Die Ulcushäufigkeit allein lag bei 3,5 %.

Experimentell findet sich bei Ausschluß des Pfortaderblutes durch eine Eck'sche Fistel stets eine Hypersekretion (LEBEDINSKAJA 1933; CLARKE, OZERAN, HART, CRUZE und CREVLING 1958; CLARKE, McKISSOCK und CRUZE 1959; WANTZ und PAYNE 1961; HAYASHI, RHEAULT, SEMB und NYHUS 1968).

Da das im Gastrinintestinaltrakt gebildete Gastrin die Leber vor seiner säurestimulierenden Wirkung am Magenfundus passieren muß, ist es naheliegend, Leberschädigung, verminderte Inaktivierung von Gastrin und Ulcuskrankheit im Zusammenhang zu sehen.

Bei den vorliegenden Untersuchungen wird eindeutig nachgewiesen, daß die Leber in der Lage ist, Gastrin zu inaktivieren und weiter abzubauen. Die Hypersekretion und Ulcusgenese bei ernöhten Serumgastrinspiegeln, bei portocavaler Anastomose und Leberzirrhose lassen den Schluß zu, daß ein gestörter Gastrinstoffwechsel einer der auslösenden Faktoren beim "hepatogenen Ulcus" ist.

E. Zusammenfassung

1. Der Abbau von aus Schweinemägen rein dargestelltem Gastrin durch partikelfreie Überstände aus Rattenleberhomogenat wurde chromatographisch und elektrophoretisch untersucht.
 2. Weiterhin wurde untersucht, ob nach experimenteller Leberschädigung bei der Ratte eine Veränderung des Abbauvermögens von Gastrin durch partikelfreie Überstände auftritt.
- ad 1: Es gelang in vitro die Hydrolyse von Gastrin II durch partikelfreien Überstand (104.000 g) aus Rattenleberhomogenat nachzuweisen. Nach Desamidierung von Gastrin II durch eine spezifische Amidase bei pH 6,4 wird Desamido-gastrin in Abhängigkeit von der Zeit vollständig in niedermolekulare Spaltprodukte aufgetrennt. Aufgrund der elektrophoretischen Ergebnisse muß angenommen werden, daß es sich bei diesen Spaltprodukten um Di- und Tripeptide handelt.
- Bei Rechromatographie der am längsten inkubierten Fraktion ließen sich 4 Unterfraktionen unterschiedlichen Molekulargewichtes auftrennen.
- ad 2: Die Abnahme des Inaktivierungsvermögens gegenüber Gastrin I konnte bei CCl_4 -geschädigten Rattenlebern im Vergleich zu normalem Lebergewebe nicht gemessen werden, da es sehr wahrscheinlich bei den geschädigten Proben wie bei den Kontrollen infolge der Lagerungszeit (bis zu 100 Tage) zu einer Abnahme der Enzymaktivität gekommen war. Jedoch muß, gerade aufgrund des nachgewiesenen Abbaus von Gastrin durch Lebergewebe, bei Leberschädigung mit einem eingeschränkten Gastrinkatabolismus und dessen Auswirkungen auf das Rezeptororgan Magenfundus gerechnet werden.

F. Literaturverzeichnis

1. ALDERMAN, S.J., KEITER, J.E., CHANDLER, J.G., ROSEN, H.
und ORLOFF, M.J.:
Basal and stimulated gastric secretion in man with
cirrhosis with and without portacaval shunt
Surg. Forum 20, 363 (1969)
2. ANDERSON, J.C., BARTON, M.A., GREGORY, R.A., HARDY, P.M.,
KENNER, G.W., McLEOD, J.K., PRESTON, J., SHEPPARD, R.C.
und MORLEY, J.S.:
The antral hormone gastrin. Synthesis of gastrin
Nature 204, 933 (1964)
3. ARNOLD, R., KETTERER, H., FEURLE, G., CREUTZFELDT, C.
und CREUTZFELDT, W.:
Korrelation von Serumgastrinspiegeln mit dem Gastrin-
gehalt und den G-Zellen der Antrumschleimhaut beim
Menschen
Verh. dtsch. Ges. inn. Med. 77, 507 (1971)
4. BAUR, A.G.:
Zum hepatogenen Ulcus pepticum nach Jahn
Med. Klin. 44, 537 (1949)
5. BEGER, H.G.:
zit. nach: SEELIG, H.P.: Gastrin - Inaktivierung und
Abbau
Habilitationsschrift FU Berlin 1971, FB IV
6. BEGER, H.G.:
Der Einfluß der Leber auf die Wirkung von Pentagastrin,
Gastrin I und Gastrin II. Untersuchungen am Menschen
Habilitationsschrift FU Berlin, FB IV

7. BENTLEY, P.H., KENNER, G.W. und SHEPPARD, R.C.:
Human gastrin. Isolation, structure and synthesis.
Structures of human gastrins I and II
Nature 209, 583 (1966)
8. BERSON, S.A. und YALOW, R.S.:
Nature of immunoreactive gastrin extracted from
tissues of gastrointestinal tract
Gastroenterology 60, 215 (1971)
9. BÜCHNER, F.:
Die Pathologie der cellulären und geweblichen Oxyda-
tionen. In: Handbuch der allgemeinen Pathologie, hrsg.
von F. BÜCHNER, E. LETTERER, F. ROULET, Vierter Band
Der Stoffwechsel II, Springer, Berlin-Göttingen-
Heidelberg 1957
10. CHARTERS, A.C., REEDER, D.D. und THOMPSON, J.C.:
Measurement of gastrin in the gastrointestinal
mucosa by radio-immunoassay
Surg. Forum 20, 310 (1969)
11. CLARKE, J.S., McKISSOCK, P.K. und CRUZE, K.:
Studies on the site of origin of the agent causing
hypersecretion in dogs with portacaval shunt
Surgery 46, 48 (1959)
12. CLARKE, J.S., OZERAN, R.S., HART, J.C., CRUZE, K.
und CREVLING, V.:
Peptic ulcer following portacaval shunt
Ann.Surg. 148, 551 (1958)
13. CREUTZFELDT, W.:
Erkrankungen der Bauchspeicheldrüse. In: Lehrbuch
der Inneren Medizin, hrsg. von R. GROSS, D. JAHN und
P. SCHÜLMERICH; Schattauer, Stuttgart 1970 (S. 509)

14. EDKINS, J.S.:
On the chemical mechanism of gastric secretion
Proc.Roy.Soc.Med.B. 76, 376 (1905)
15. EDKINS, J.S.:
The chemical of gastric secretion
J. Physiol. 34, 133 (1906)
16. FRIESEN, S.R., BOLINGER, R.E., PEARSE, A.G.E. und
McGUIGAN, J.E.:
Serum gastrin levels in malignant Zollinger-
Ellison syndrome after total gastrectomy and
hypophysectomy
Ann.Surg. 172, 504 (1970)
17. GANGULI, P.C., CULLEN, D.R. und IRVINE, W.J.:
Radioimmunoassay of plasma-gastrin in pernicious
anaemia, achlorhydria without pernicious anaemia, hypo-
chlorhydria, and in controls
Lancet I, 155 (1971)
18. GILES, G.R., WASON, M.C., HUMPHRIES, C. und CLARK, C.G.:
Action of gastrin on lower oesophageal sphincter in
man
Gut. 10, 730 (1969)
19. GILLESPIE, I.E. und GROSSMAN, M.I.:
Gastric secretion of acid in response to portal
and systemic venous injection of gastrin
Gastroenterology 43, 189 (1962)
20. GINGELL, J.C., DAVIES, M.W. und SHIELDS, R.:
Effect of a synthetic gastrin-like pentapeptide
upon the intestinal transport of sodium, potassium
and water
Gut. 9, 111 (1968)

21. GREGORY, R.A., TRACY, H.J., AGARWAL, K.L. und GROSSMAN, M.I.:
Aminoacid constitution of two gastrins isolated from Zollinger-Ellison tumour tissue
Gut. 10, 603 (1969)
22. GREGORY, R.A.:
Memorial Lecture:
The isolation and chemistry of gastrin
Gastroenterology 51, 953 (1966)
23. GREGORY, R.A., TRACY, H.J. und GROSSMAN, M.I.:
Human Gastrin:
Isolation of two gastrins from human antral mucosa
Nature 209, 583 (1966)
24. GREGORY, H., HARDY, P.M., JONES, D.S., KENNER, G.W. und SHEPPARD, R.C.:
The antral hormone gastrin. Structure of gastrin
Nature 204, 931 (1964)
25. GREGORY, R.A. und TRACY, H.J.:
The constitution and properties of two gastrins extracted from hog antral mucosa
Gut. 5, 103 (1964)
26. GROSSMAN, M.J.:
Physiological role of gastrin
Fed. Proc. 27, 1312 (1968)
27. HANSKY, J. und CAIN, M.D.:
Radioimmunoassay of gastrin in human serum
Lancet Dec. 27, 1388 (1969)
28. HANSKY, J., KORMAN, M.G., SOVENY, C. und St. JOHN, D.J.B.:
Radioimmunoassay of gastrin: studies in pernicious anemia
Gut. 12, 97 (1971)

29. HAYASHI, K., RHEAULT, M.J., SEMB, L.S. und NYHUS, L.M.:
The effect of splenocaval shunt on gastric secretion
and liver function as compared with other shunting
procedures in the dog
Surgery 64, 1084 (1968)

30. ISENBERG, J., CSENDES, A. und WALSH, J.:
Resting and pentagastrin-stimulated gastroesophageal
sphincter pressure in patients with Zollinger-Ellison-
syndrom
Gastroenterology 61, 655 (1971)

31. ISHIMORI, A., NEMOTO, K., SHIMOYAMA, M. und JAMAGATA, S.:
Inactivation of gastrin-like synthetic peptide by
the liver and serum and its clinical significans
Tohoku J. exp. Med. 103, 61 (1971)

32. JAFFE, B.M. und NEWTON, W.T.:
Distribution and localization of radioiodinated
gastrin
Surg. Forum 20, 312 (1969)

33. JAHN, D.:
Das hepatogene Ulcus pepticum
Med. Klin. 41, 221 (1946)

34. KOLAROV, S.A.:
Gastrin
Amer. J. Physiol. 123, 121 (1938)

35. KRÖNER, H. und STAIB, W.:
Leberenzyme bei akuter Tetrachlorkohlenstoffvergiftung
Z. klin. Chem. 6, 318 (1968)

36. LAI, K.S.:
Studies on gastrin
Gut. 5, 327 (1964)

37. LASTER, L. und WALSH, J.H.:
Enzymatic degradation of c-terminal tetrapeptide
amide of gastrin by mammalian tissue extracts
Fed.Proc. 27, 1328 (1968)
38. LEBEDINSKAJA, S.I.:
Über die Magensekretion bei Eckschen Fistelhunden
Z. exper. Med. 88, 264 (1933)
39. LeVEEN, H.H. und BOREK, B.:
Role of liver metabolism of gastrin in gastric
secretion. (Abstr.)
Fed.Proc. 28, 718 (1969)
40. LICK, R.F., WELSCH, K.H., HART, W., BRÜCKNER, W.,
BALSER, D. und GÜRTNER, Th.:
Zur sekretorischen Funktion des Magens nach In-
jektion von Histamin, Gastrin und synthetischem
Tetrapeptid in den großen Kreislauf und in die
Pfortader
Z. Gastroenterologie 5, 7 (1967)
41. McGUIGAN, J.E. und THOMAS, H.F.
Physiological and immunological studies with
desamidogastrin
Gastroenterology 62, 553 (1972)
42. McGUIGAN, J.E. und GREIDER, M.H.:
Correlative, immunochemical and light microscopic
studies of the gastrin cell of the antral mucosa
Gastroenterology 60, 223 (1971)
43. McGUIGAN, J.E., JAFFE, B.M. und NEWTON, W.T.:
Immunochemical measurements of endogenous gastrin
release
Gastroenterology 59, 499 (1970)

44. McGUIGAN, J.E. und TRUDEAU, W.L.:
Serum gastrin concentrations in pernicious anemia
New Engl. J. Med. 282, 358 (1970)
45. McGUIGAN, J.E.:
Gastric mucosal intracellular localization of
gastrin by immunofluorescence
Gastroenterology 55, 315 (1968)
46. McGUIGAN, J.E. und TRUDEAU, W.L.:
Immunochemical measurement of elevated levels of
gastrin in the serum of patients with pancreatic
tumors of the Zollinger-Ellison variety
New Engl. J. Med. 278, 1308 (1968)
47. McLEAN, A.E.M. und McLEAN, E.K.:
The effect of diet and 1,1,1-trichloro-2,2-bi-(p-
chlorophenyl)ethane (DDT) on mikrosomal hydroxylating
enzymes and on sensitivity of rats to carbon tetra-
chloride poisoning.
Biochem. J. 100, 564 (1966)
48. MORLEY, J.S.:
Structure-activity relationships
Fed.Proc. 27, 1314 (1968)
49. MORLEY, J.S., TRACY, H.J. und GREGORY, R.A.:
Structure-function relationships in the active
c-terminal tetrapeptide sequence of gastrin
Nature 207, 1356 (1965)
50. ORLOFF, M.J., CHANDLER, J.G., ALDERMAN, S.J., KEITER,
J.E. und ROSEN, H.:
Gastric secretion and peptic ulcer following
portocaval shunt in man
Annals of Surgery 170, 515 (1969)

51. PTAK, Th. und KIRSNER, J.B.:
The Zollinger-Ellison-syndrom, polyendocrine
adenomatosis and other endocrine associations
with peptic ulcer
Advanc. intern. Med. 16, (1970)
52. REHFELD, J.F.:
Effect of gastrin and its c-terminal tetrapeptide
on insulin secretion in man
Acta Endocrinol. 66, 169 (1971)
53. RYDON, H.N. und SMITH, P.W.G.:
A new method for the detection of peptides
and simular compounds on paper chromatograms
Nature 169, 922 (1952)
54. SCHMIDT, F.H. und SCHWARZ, M.:
Über die enzymatische Ammoniakbestimmung im Blut
Klin.Wschr. 44, 591 (1966)
55. SCHRIEFERS, K.H., SCHREIBER, H.W. und ESSER, G.:
Zur Frage der Magensaftsekretion und des Magen-
Duodenalulcus beim Pfortaderhochdruck der Leber-
cirrhose und nach porto-cavalen Shunt-Operationen
Langenbecks Arch.klin.Chir. 302, 702 (1963)
56. SEELIG, H.P.:
Gastrin - Inaktivierung und Abbau
Habilitationsschrift FU Berlin 1971
57. SEELIG, H.P., MÜLLER, U. und LINTHE, H.:
Inactivation of gastrin II by rat tissue homogenates
human serum and liver amidases
Acta Hepato-Gastroenterol 20, 142 (1973)

58. SHEARMAN, D.J.C., FINLAYSON, N.D.C., MURRAY-LYON, I.M.,
SAMSON, R.R. und GIRDWOOD, R.H.:
Intrinsic-factor secretion in response to pentagastrin
Lancet I, 192 (1967)
59. SIEBERT, G.:
Biochemie der Zellstrukturen
In: Handbuch der allgemeinen Pathologie, hrsg. von
F. BÜCHNER, E. LETTERER, F. ROULET Zweiter Band
Die Zelle Fünfter Teil, Springer Berlin-Göttingen-
Heidelberg 1968
60. SMITH, G.W., LAWRENCE, A.J., COLIN-JONES, D.G. und
SCHILD, H.O.:
The assay of gastrin using the perfused rat stomach
Br. J. Pharmac. 38, 206 (1970)
61. SMUCKLER, E.A. und BENDITT, E.P.:
Studies on carbon tetrachloride intoxication. III. A
subcellular defect in protein synthesis.
Biochemistry 4, 671 (1965)
62. STELZNER, F.:
Leberveränderungen und Gastroduodenales Ulcus
Verh.Dtsch.Ges.Inn.Med. 75, 264 (1969)
63. STREMPLE, J.F. und MEADE, R.C.:
Production of antibodies to synthetic human gastrin I
and radioimmunoassay of gastrin in the serum of patients
with the Zollinger-Ellison syndrome
Surgery 64, 165 (1968)
64. SWISHER, W.P., BAKER, L.A. und BENNETT, H.D.:
Peptic ulcer in Laennec's cirrhosis
Am.J.Digest.Dis. 22, 291 (1955)

65. TEMPERLEY, J.M., STAGG, B.H. und WYLLIE, J.H.:
Disappearance of gastrin and pentagastrin in the
portal circulation
Gut. 12, 372 (1971)
66. TEMPERLEY, J.M., WYLLIE, J.H. und STAGG, B.H.:
Inactivation of gastrin and pentagastrin in the
portal circulation
Gut. 11, 1061 (1970)
67. THOMPSON, J.C., REEDER, D.D., DAVIDSON, W.D.,
CHARTERS, A.C., BRÜCKNER, W.L., LEMMI, C.A.E. und
MILLER, J.H.:
Effect of hepatic transit of gastrin, pentagastrin
and histamine measured by gastric secretion and by
assay of hepatic vein blood
Ann.Surg. 170, 493 (1969)
68. TRACY, H.J. und GREGORY, R.A.:
Physiological properties of a series of synthetic
peptides structurally related to gastrin I
Nature 204, 935 (1964)
69. TRUDEAU, W.L. und MCGUIGAN, J.E.:
Effects of calcium on serum gastrin levels in the
Zollinger-Ellison syndrome
New Engl. J. Med. 282, 862 (1969)
70. UNGER, R.H., KETTERER, H., DUPRE, J. und
EISENTRAUT, A.M.:
The effect of secretion, pancreozymin, and gastrin
on insulin and glucagon secretion in anesthetized
dogs
J.Clin.Invest. 46, 630 (1967)

71. WANTZ, G.E. und PAYNE, M.A.:
Experience with portacaval shunt for portal
hypertension
New Engl. J. Med. 265, 721 (1961)
72. YALOW, R.S. und BERSON, S.A.:
Further studies on the nature of immunoreactive
gastrin in human plasma
Gastroenterology 60, 203 (1971)
73. YALOW, R.S. und BERSON, S.A.:
Radioimmunoassay of gastrin
Gastroenterologie 58, 1 (1970)
74. YALOW, R.S. und BERSON, S.A.:
Size and charge distinctions between endogenous
human plasma gastrin in peripheral blood and
heptadecapeptide gastrins
Gastroenterologie 58, 609 (1970)
75. ZATERKA, S. und GROSSMAN, M.I.:
The effect of gastrin and histamine on secretion
of bile
Gastroenterology 50, 500 (1966)
76. ZOLLINGER, R.M. und ELLISON, E.H.:
Primary peptic ulcerations of the jejunum
associated with islet cell tumors of the pancreas
Ann.Surg. 142, 709 (1955)

Die vorliegende Arbeit wurde in der Wissenschaftlichen
Einrichtung (WE 6) Pathologie im Klinikum Westend der
Freien Universität Berlin (damaliger Direktor: Prof. Dr.
med. V. Becker) unter der Aufsicht von Herrn Priv.-Doz.
Dr. med. H.-P. Seelig angefertigt.

Lebenslauf

Am 25.4.1944 wurde ich als Sohn des Stabsveterinärs Dr.med.vet. Georg Appel und dessen Ehefrau Hedwig, geb. Säck in Steinheim/Westfalen geboren.

Die Volksschule besuchte ich von 1950 - 1954. Von 1954 - 1965 Besuch des altsprachlichen Stadtgymnasiums in Dortmund. Am 3.3.1965 bestand ich dort das Abitur.

Anschließend 6 Monate Bankpraktikum bei der Commerzbank in Dortmund. Vom 1.10.1965 - 30.9.1967 Bundeswehr.

Seit WS 1967/68 Medizinstudium an der FU Berlin. Vorphysikum SS 1968. Physikum WS 1969/70. Das Medizinische Staatsexamen bestand ich am 16.8.1973.

Informationen
über

in 1975 erschienen und die von der Fachkommission
für die deutsche Sprache und Literatur der
Deutschen Akademie der Wissenschaften zu Berlin
herausgegeben werden.

Die Kommission besteht aus den Herren Prof. Dr.
Hans-Joachim Lauth, Vorsitzender, Prof. Dr.
Hans-Joachim Lauth, Prof. Dr. Hans-Joachim Lauth,
Prof. Dr. Hans-Joachim Lauth, Prof. Dr. Hans-Joachim Lauth.

Die Kommission besteht aus den Herren Prof. Dr.
Hans-Joachim Lauth, Prof. Dr. Hans-Joachim Lauth,
Prof. Dr. Hans-Joachim Lauth, Prof. Dr. Hans-Joachim Lauth.

Die Kommission besteht aus den Herren Prof. Dr.
Hans-Joachim Lauth, Prof. Dr. Hans-Joachim Lauth,
Prof. Dr. Hans-Joachim Lauth, Prof. Dr. Hans-Joachim Lauth.

